

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：28-7

課題名：生殖補助医療の安全性評価に関する研究：日本産婦人科学会登録ビクデータ（2007～2013年）を用いた調査研究と実証試験

齊藤 英和 国立成育医療研究センター

周産期・母性診療センター 副周産期・母性診療センター長

（研究成果の要約）本年度は、凍結融解胚移植が新生児出生体重に与える影響を検討し、さらに染色体異常の発症リスクを新鮮胚移植と比較検討した。その結果、2007年から2012年の6年間、凍結融解胚移植によって出生体重が増加する傾向が続いていることがわかった。次に染色体異常の発症頻度を比較したところ、ダウン症の発症頻度が凍結融解胚移植後の新生児では、低下する傾向が認められた。そこで、6年間の登録データの総数で比較したところ、凍結融解胚移植後の新生児において、ダウン症の発症リスクが、新鮮胚移植後の新生児に対して有意に低下しているが明らかになった。移植周期における治療内容により分娩様式や出生体重が影響を受ける機序は明らかでないものの、本研究により周産期予後に関わる重要な知見が得られた。さらに、ART ビクデータを用いて検討した結果、「移植あたりの妊娠率」は胚の移植ステージ、移植胚数、患者年齢による影響を受けていることが明確に示された。また、染色体異常もしくはインプリンティング疾患が疑われる患者と卵巣機能障害患者の検体を集積し、遺伝子解析を行った。重要な成果として、日本人患者における既知インプリンティング疾患の頻度と臨床像を明らかとし、多座位インプリンティング異常を同定した。また、性染色体複雑構造異常の発症機序を明らかとした。今後、これらの情報をもとに、児の健康に影響を与える母体因子やART手技を解明する。

### 1. 研究目的

我々はこれまで、生殖補助医療（以下ART）が出生児の予後に与える影響について報告してきた。その中で、凍結融解胚移植後妊娠と新鮮胚移植後妊娠を比較して、正産期の出生児は出生体重が約100g重くなることを報告した。また、胚の培養期間を胚盤胞まで延長することや、胚移植時にホルモンの補充を行うことにより、このリスクが増加することを示してきた。一方、自然周期での採卵・新鮮胚移植は、卵巣刺激下に採卵・移植した場合と比較して低出生体重児（2,500g未満）となるリスクが低下することが知られている。以上の結果は、ARTが児の予後に影響を及ぼすことを示唆している。

さらに昨年解析から、ホルモン補充周期（以下、HRT周期）での胚移植後妊娠は、自然排卵周期移植後妊娠と比較して、分娩時に帝王切開術の頻度が増加することが示唆された。帝王切開術は分娩に対する人為的介入であるため、母体の周産期予後に

わる一方で、児の出生時体重にも大きく影響を与える。一般的に帝王切開はその適応により、施行週数が異なる。骨盤位や胎盤の位置異常など、陣痛開始前に把握されている病態に対しては、通常妊娠38週までに介入が行われる。これらの群では、児の出生時体重は自然経過の後に経膈分娩した例と比較して小さくなる。

胚移植周期における母体の内分泌環境は、子宮の内膜および胎盤の形成に関わり、胚の培養、凍結融解操作は胎児のエピジェネティクスに影響を及ぼす可能性が報告されているものの、これら治療と出生児の予後に関しては十分に検討されておらず、治療により新生児の出生体重に差が出る原因は未だ明らかではない。我々が以前に行った凍結融解胚を移植した場合の出生体重の増加についても、一時的な傾向なのか、連続して続いているのか、さらに出生前後の疾患発症、特に染色体異常の発症頻度に対する影響といった解析可能な課題についても、対象サンプル数が少ないために検体

数を増えるのを待っての解析が必要であった。

そこで本年は、凍結融解胚移植が児の体重および染色体異常の発症に与える影響を明らかにすることを目的として解析を行った。解析対象を過去の2年分(2007、2008年)から、過去6年分(2007~2012年)に拡大して新生児の出生体重への影響および染色体異常の発症リスクについて詳細に検討した。

## 2. 研究組織

研究者	所属施設
齊藤 英和	国立成育医療研究センター
苛原 稔	徳島大学
宮戸 健二	国立成育医療研究センター
深見 真紀	同上

## 3. 研究成果

(1) 妊孕性知識啓発の長期的効果に関する検討

(イ) 妊孕性知識の長期的効果

反復測定分散分析から、男女とも介入群と測定時期に有意な交互作用が確認された。介入群ではT3の知識はT1より有意に高く、T2より有意に低かった。男性ではT1-T2間で26%の知識増、T2-T3間で12%の知識減、T1-T3全体では11%の知識増であった。女性ではT1-T2間で29%の知識増、T2-T3間で17%の知識減、T1-T3全体では7%の知識増であった。

(ロ) 結婚と生殖の状況

T3の婚姻状況は群間で差がなかった。T1時点で既にパートナーのいた男女454人のうち94人(20.7%)が「新たに出産した」ものの、パートナーのいなかった289人では「新たに出産した」のは1名だけであった。T1時点でパートナーがいた者について、2年間の累積出産率について図2に示した。介入群と対照群2の出産のパターンは類似していたが、対照群1と比較すると、介入後1年以内に出産した者の割合は男性で8.8%対1.4%( $p=0.09$ )、女性で10.6%対2.3%( $p=0.03$ )であった。年齢調整した場合の介入群の1年以内の出産のオッズ比は男性で7.8(95%CI: 0.86-70.7)、女性で5.2(95%CI: 1.09-25.0)であった。また、T1時点でパートナーがいて受診の既往がなかった383人中32人

が新規受診しており、パートナーがおらず受診既往のなかった287人中1人が新規受診していた。そこでT1にパートナーがいた者について分析を行うと、男性では介入群で12%、対照群2で1.5%( $p=0.04$ )が新規受診していた。女性では、どの群でも新規受診者の割合は8~10%で差はなかった。

(2) 単一胚移植と凍結胚移植が生殖補助医療の及ぼす影響

移植周期回数ごとの妊娠率、および全体の累積妊娠率では、移植回数による妊娠率の低下は顕著では無いが、5回目の移植後は、妊娠例の実数としての増加は限定的であり、5回胚移植までの累積妊娠率が、累積妊娠率として有用であることが示唆された。各年齢群毎の成績は、年齢と累積妊娠率の間に関連性を認めた。ART既往妊娠の有無による累積妊娠率の差を年毎に解析したところ、特に35歳以下の群では、既往妊娠がある群で初回移植あたりの妊娠率が有意に高く、その後の累積妊娠率にも有意な差が認められた。採卵回数別に、ART妊娠既往の有無による累積妊娠率の差を解析したが、一定の傾向は認められなかった。

(3) 凍結胚治療による新生児の体重増加の分子機構の解明

(イ) 不妊症患者の顆粒膜細胞におけるオートファジーの機能不全と染色体の断片化

高い受精率や、その後の良好な発育には、採卵時の卵子の質が重要であるものの、卵子の質は、卵子の形態から評価されているのが現状である。本研究では、顆粒膜細胞の質の低下の原因としての細胞死の制御メカニズムの解明と、細胞死の前段階を判定するためのバイオマーカーの同定を試みた。

我々が着目したのは、ジャンク・タンパク質や機能異常を起こした細胞内小器官をリサイクルする機構として知られるオートファジーである。まず、ART患者から回収された顆粒膜細胞を用いて、微小管結合タンパク質であり、オートファゴソームの形成初期に働くLC3の発現量および細胞内局在を調べた。顆粒膜細胞は卵丘細胞(cumulus cells)と卵壁顆粒膜細胞(mural granulosa cells、以下MGC)の2種類に分類される。本研究では卵丘細胞をさらに形態から、

immature、mature、dysmature に分類した。結果として、LC3 は MGC と dysmature で高い発現を示し、染色体 DNA の断片化が進んでいることが分かった。しかしながら、オートファゴソーム膜に局在する LC3-II は MGC だけに検出された。さらに、オートファゴソーム形成において LC3 の前段階に関わる ATG7 の発現を調べたところ、他の細胞に比べて MGC で有意に高い発現がみられた。予想外なことに dysmature では immature と mature よりも ATG7 の発現は低いことがわかった。

これらの結果から、(1) 通常のオートファジーは MGC でのみ起こるものの、結果として細胞死に至ってしまう、(2) dysmature では LC3 の発現は高いものの、LC3-I から LC3-II への変換は起こらず、ATG7 の発現が低いことから、オートファジーは機能不全に陥っており、MGC とは異なるメカニズムで細胞死に至る可能性が推測された。本研究から、LC3 と ATG7 が、顆粒膜細胞が細胞死に至ることを予測するためのバイオマーカーとなりうることを示された。

#### (ロ) 子宮内膜再生における CD9 の役割

膜貫通型タンパク質 CD9 はあらゆる細胞で発現し、受精、特に配偶子融合において、卵側因子として必須である。また、CD9 はエクソソームよりさらに微細な細胞外微粒子(マイクロエクソソーム)の構成因子として働き、卵の細胞膜から CD9 を含む細胞外微粒子が放出され、精子頭部に作用することにより、精子と卵の融合を促進する。さらに、マウスの子宮内腔液を用いた検証実験から、子宮内膜上皮細胞からも CD9 を含む細胞外微粒子が放出され、出産後の子宮再生に寄与することが報告されている。しかしながら、子宮内膜上皮細胞から CD9 を含むマイクロエクソソームが放出される詳細なメカニズムについては未だに解明されていない。そこで子宮内膜上皮細胞と子宮内腔液中の CD9 の動態を解析することにより、CD9 を含むマイクロエクソソームの分泌メカニズムを解明することを目的とした。

マウス子宮内膜上皮細胞の性周期に伴う CD9 の局在変化を検証したところ、発情期と発情間期では基底膜側に CD9 が局在するのに対し、着床期では基底膜と対側の子宮

内腔側に局在しており、性周期に応じた CD9 の再配置が起こることが明らかとなった。さらに、着床期の CD9 の局在と胚の着床部位は一致していた。またマウス子宮内腔液中での CD9 の分泌量を、性周期別にイムノブロット法により解析したところ、全性周期を通じ CD9 の分泌を認めるものの、発情期のマウス子宮内腔液中で最も多くの CD9 が検出された。また、子宮内膜上皮細胞における CD9 含有量を性周期別に検証したところ、発情期で最も低下していた。

以上の結果から、発情期に子宮内膜上皮細胞から CD9 は分泌され、全性周期を通じて子宮内腔液中に含まれることで、子宮内膜上皮の機能維持に関わっていることが推測された。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた検証により、ヒトの子宮内腔液中においても CD9 を含むマイクロエクソソームが分泌される可能性が強く示唆された。さらに、マウス子宮内膜上皮の透過型電子顕微鏡解析より、CD9 遺伝子欠損型マウスから採取した子宮内膜上皮細胞では野生型と比較して、微絨毛が粗かつ短小化しており、また、子宮内膜上皮細胞内のミトコンドリア数が優位に減少していることが明らかとなった。

これらの解析結果から、子宮内膜上皮細胞の膜タンパク質 CD9 の再配置と細胞外分泌が、子宮内膜上皮細胞の膜構造とミトコンドリア数に影響を及ぼし、さらに子宮内膜の再生により内膜機能を制御することが明らかになった。

#### (4) 凍結胚治療が児に与える染色体レベルでの影響および不妊症の分子基盤の解明

##### (イ) 発育障害患者の解析

A) 不妊治療後に生まれ、発育障害、気管軟化症、新生児一過性糖尿病、発達遅滞、小奇形を呈した乳児 1 例において 5 つの染色体に散在する多焦点性ゲノム再構成を同定した。このゲノム再構成には、単純な重複と逆位その他、クロモソリプシス(染色体破砕)に合致する複雑構造異常が含まれていた。われわれはこの患児の新生児一過性糖尿病は 6 番染色体 DMR の低メチル化による PLAGL1 過剰発現に起因することを明らかとした。さらに、5 つの染色体の微細構造異常がすべて減数分裂前の精巢生殖細胞にお

いて生じたものであることを見出した。以上の成績は、ヒトの精子形成過程の限局した段階において、多焦点性ゲノム再構成を生じる未知の機構が機能していることを示唆する。

B) 成長障害を呈する患者の網羅的 DNA メチル化解析を行い、20 番染色体母性片親性ダイソミーが成長障害を、7 番染色体父性片親性ダイソミーが出生後の過成長を招くことを明らかとした

#### (ロ) 不妊症患者の解析

非閉塞性無精子症患者 131 例を対象とした変異スクリーニングによって、1 例で STX2 ホモ接合性機能喪失変異を同定した。STX2 は、Sulfoglycolipid のトランスポーターであり、マウスの無精子症原因遺伝子として知られている。今回同定された患者は、近親婚によってまれな機能喪失変異をホモ接合性に有するようになったと推測される。このことから、STX2 がヒト生殖機能障害原因遺伝子であることが初めて明らかとなった。一方、STX2 の病的変異は患者 131 例中 1 名のみと同定されたことから、無精子症の原因のごく一部を占めることが示唆された。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究の遺伝子解析研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して実施した。研究参加への同意は全て患者本人もしくは両親から書面で取得され、同意書および患者と匿名化番号の対応表は、

個人情報管理者により厳重に保管されている。この規定の遵守については、毎年、外部委員の監査を受けている。

本研究に関し、下記課題が承認されている。

(1) 性分化疾患・性成熟疾患・生殖機能障害における遺伝的原因の探索 (国立成育医療研究センター課題番号 512; 代表 深見真紀)

(2) 卵巣機能不全の分子基盤の探索 (国立成育医療研究センター課題番号 646; 代表 深見真紀)

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施した(承認番号 2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめた。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮を行った。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。ヒト精漿タンパク質の使用について倫理委員会から承認された(女性の生理機能に影響を与える男性由来タンパク質および脂質の探索と作用機序の解明 宮戸健二 受付番号 821)。

臨床データ解析に関しては、治療上に必要な既に検査された値の解析のみである。マウスを用いた実験については、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う予定である。